

**IsoxazolyI — Penicillin —
Rückstände in Konsummilch
nach intramammärer
Trockenzeittherapie beim Rind**

Barbara Wallner

1972

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie
der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. G. Terplan

Isoxazolyl - Penicillin - Rückstände in Konsummilch
nach intramammärer Trockenzeittherapie beim Rind

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Barbara Wallner
aus
Sønderborg / Dänemark

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der

Tierärztlichen Fakultät der Universität München



Dekan : Professor Dr. J. Boessneck

Referent : Professor Dr. G. Terplan

Korreferent : Professor Dr. K. Walser

Tag der Promotion : 14. Juli 1972

Meiner Mutter in großer Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	5
II. SCHRIFTTUM	7
A. Allgemeine Erörterungen über Hemmstoffe in der Milch	7
B. Antibiotika - Rückstände in der Milch nach therapeutischen oder prophylaktischen Maß- nahmen	9
C. Nachweis von Hemmstoffen in der Milch	15
D. Mikrobiologischer Nachweis von Antibiotika - Rückständen	17
1. Agardiffusionsverfahren	18
a) Agardiffusionsverfahren mit <i>Bac. subtilis</i>	19
☛ Nachweisgrenzen	20
b) Agardiffusionsverfahren mit <i>Bac. stearo-</i> <i>thermophilus var. calidolactis</i>	20
☛ Nachweisgrenzen	21
2. Weitere Verfahren	22
E. Inaktivierung von Antibiotika in der Milch	25
F. Natürliche Hemmstoffe in der Milch	26
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	29
A. Material	29
1. Testsubstanzen	29
2. Testkeime	29
3. Verdünnungsmedien	30
4. Nährmedien	30

5. Präparat für die intrazisternale Applikation	30
6. Milchproben	30
B. Methodik	31
1. Agardiffusionsverfahren in Form des Loch - testes mit <i>Bac. subtilis</i>	31
2. Agardiffusionsverfahren in Form des Loch - testes mit <i>Bac. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	33
3. Agardiffusionsverfahren in Form des Loch - testes mit <i>Bac. cereus</i>	34
4. Herstellung von Antibiotika - Standards	34
5. Auswertung der Ergebnisse	35
6. Intrazisternale Applikation von Oxacillin	36
7. Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe	36
C. Versuche und Versuchsergebnisse	37
1. Streuung der Hemmhofgrößen und Aufbewahrungs- dauer des Testagars	37
2. Nachweisgrenze von Penicillin G - Kalium in Rohmilch und sterilisierter Magermilch	39
3. Nachweisgrenzen für Oxacillin und andere Antibiotika im Lochtest mit <i>Bac. stearother-</i> <i>mophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	42
4. Unspezifische Hemmung von Kolostrum gegenüber <i>Bac. subtilis</i> , <i>Bac. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> und <i>Bac. cereus</i>	45
5. Unspezifische Hemmung von Mastitissekreten unbehandelter Kühe gegenüber <i>Bac. subtilis</i> ,	52

Bac. stearothermophilus var. calidolactis

und Bac. cereus

6. Vorkommen von Hemmstoffen in Konsummilch nach 58
intrazisternaler Applikation von Oxacillin mit
Depotwirkung in der Trockenzeit

IV. DISKUSSION 60

V. ZUSAMMENFASSUNG 65

VI. LITERATURVERZEICHNIS 69

I. EINLEITUNG

Als eine wichtige Maßnahme zur Verhütung und Bekämpfung der subklinischen Mastitiden des Rindes muß die intra - zisternale Applikation von Antibiotika mit Depotwirkung in der Phase des Trockenstellens oder in der Trockenzeit angesehen werden. In einzelnen Ländern wird sogar eine systematische Behandlung aller, auch der eutergesunden Kühe, für diese Phase empfohlen. Wegen der Zunahme penicillinresistenter, d.h. penicillinasebildender, euter - pathogener Staphylokokken verdienen die Isoxazolyl-Penicilline, die als halbsynthetische Penicilline gegenüber Penicillinase weitgehend stabil sind, besondere Beachtung. Die Isoxazolyl-Penicilline Cloxacillin und Oxacillin werden in der Mastitistherapie zunehmend eingesetzt und es ist zu erwarten, daß sie die biosynthetischen Penicilline im Rahmen einer allgemeinen Trockenzeittherapie verdrängen können, zumal in diesem Zusammenhang mit einer Antibio - grammbestimmung euterpathogener Erreger nicht zu rechnen ist. Diese Aspekte verdienen das besondere Interesse des Milchhygienikers, da gesichert sein muß, daß bei dieser Behandlung Rückstände des Antibiotikums zu Beginn der nachfolgenden Laktation nicht in die Milch gelangen können.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag darüber zu liefern, in welcher Form der Nachweis von Isoxazolyl-Penicillin, insbesondere Oxacillin, in der Milch

geführt werden sollte und in welchem Umfang Oxacillin nach intrazisternaler Applikation in einer späteren Phase der Trockenzeit mit der Milch ausgeschieden wird.

II. S C H R I F T T U M

A. Allgemeine Erörterungen über Hemmstoffe in der Milch

Als Hemmstoffe werden Substanzen bezeichnet, die Wachstum und Stoffwechsel von Mikroorganismen zu hemmen vermögen. Sie wirken bakterizid oder bakteriostatisch. Es kann sich hierbei um körpereigene Hemmstoffe oder um Rückstände aktiv oder passiv vom Körper aufgenommener Wirkstoffe (Arzneimittel, Futter, Insektizide) handeln, die mit der Milch ausgeschieden werden. Außerdem können Reste von Reinigungs-, Desinfektions- und Konservierungsmitteln und im weiteren Sinne die Bakteriophagen als Hemmstoffe betrachtet werden (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

Reinigungs- und Desinfektionsmittel wirken erst in höheren Konzentrationen hemmend auf die Milchsäurebakterien. Bei vorschriftsmäßiger Anwendung, selbst bei Unterlassung des Nachspülens, ist keine Beeinflussung des Keimwachstums zu beobachten (SEELEMANN und WEGENER, 1957). SEELEMANN und WEGENER zeigten im Tierversuch an Ratten, daß selbst die zehnfache Menge jener Dosis, die bei Unterlassung des Nachspülens nach der Desinfektion der Kannen in die Milch gelangen könnte, zu keinerlei gesundheitlichen Schäden bei den Versuchstieren führte. Erst bei grobfahrlässiger Anwendung von Desinfektionsmitteln oder vorsätzlichem Zusatz von Konservierungsmitteln in betrü-

gerischer Absicht zum Zwecke der Verlängerung der Haltbarkeit oder Vortäuschung einer guten bakteriologischen Beschaffenheit der Milch tritt eine im mikrobiologischen Test nachweisbare Hemmwirkung auf (KOTTER, TERPLAN und PFEIFFER, 1962 ; SEIDEL, 1967).

Die größte Bedeutung unter den in der Milch vorkommenden Hemmstoffen haben die Arzneimittel.

Früher wurden recht häufig Sulfonamide zur Mastitistherapie angewandt. Sie können nach intramammärer, parenteraler und oraler Verabreichung in der Milch auftreten und bei entsprechender Dosierung auch eine Hemmwirkung ausüben. Die Ausscheidungsdauer wird von Art und Konzentration des Sulfonamids beeinflußt und kann verhältnismäßig kurz sein, bei intrazisternaler Infusion etwa 24 Stunden (BRUNTSCHWILER, 1961). OBIGER (1963) berichtete, ebenso wie HAUKE (1965), daß nur gemischte Kulturen der Milchsäurebildner durch Sulfonamide gehemmt wurden, während die Reinkulturen relativ resistent waren.

Durch ihre häufige und vielseitige Anwendung, insbesondere in der Mastitistherapie und -prophylaxe, sind die Antibiotika unter allen in der Milch vorkommenden Hemmstoffen ohne Zweifel am bedeutungsvollsten.

Antibiotika sind chemisch definierte Stoffe biologischen Ursprungs, die ohne Enzymcharakter zu besitzen - in geringen Konzentrationen Wachstumsvorgänge hemmen (AUTERHOFF, 1971). Nur ein kleiner Teil der in der Natur

vorkommenden Antibiotika ist zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten verwertbar, da nur die Antibiotika verwendet werden können, die den Stoffwechsel lebender Körperzellen kaum oder gar nicht beeinflussen (FRIMMER, 1969).

B. Antibiotika - Rückstände in der Milch nach therapeutischen oder prophylaktischen Maßnahmen

Antibiotika werden mit der Milch unter bestimmten Bedingungen nach intramammärer, parenteraler und oraler Verabreichung ausgeschieden.

Bei parenteraler Gabe hoher Dosen Antibiotika kann es zum Übergang von nachweisbaren Mengen in die Milch kommen. Die Bluteuterschranke ist bei akuten Mastitiden für Antibiotika durchlässiger als bei nicht gestörter Eutergesundheit. Antibiotikaspiegel in der Milch und Ausscheidungsdauer sind abhängig von der Beschaffenheit des Präparates und der Dosis, von Applikationsform und -ort sowie vom Laktationsstadium, der Milchleistung und dem Grad der pathologisch - anatomischen Veränderungen des Milchdrüsengewebes (MIETH und WILKE, 1965 ; TERPLAN und ZAADHOF, 1967). Präparate auf öligem Grundlage weisen eine längere Ausscheidungsdauer auf, als solche mit wässriger Trägersubstanz.

Nach der i.m.-Applikation von Antibiotika erfolgt eine rasche, aber nicht lang anhaltende Ausscheidung

(WRIGHT und HAROLD, 1960). Ähnlich ist es nach der i.v.-Verabreichung.

Laut DIERNHOFFER (1955) und MIETH und WILKE (1965) ist nach intrauteriner Anwendung von Antibiotika eine Ausscheidung über die Milch nicht zu erwarten. CANNON et al. (1962) konnten nach Verabreichung einer Dosis von 1 Mio.I.E. Penicillin Spuren in der Milch feststellen, ebenso MCGILLIVRAY (1964) und SETTERGREN und THOREN (1968).

Für das Auftreten von Antibiotikarückständen in der Milch ist die intramammäre Applikation am bedeutungsvollsten. 26% - 49 % der intrazisternal angewendeten Antibiotika werden mit der Milch ausgeschieden. Sie sind dort etwa vier Tage nachweisbar, bei schweren pathologisch - anatomischen Euterveränderungen länger (Hauke, 1965).

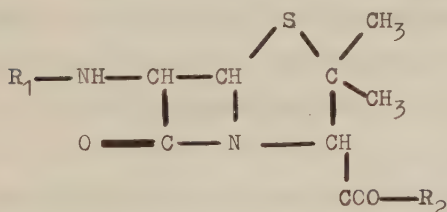
Bei intramammärer Verabreichung von Antibiotika erscheinen diese auch in den unbehandelten Vierteln (RANDALL et al. 1953 und 1954; OVERBY, 1954; BLOBEL, 1960; ORMISTON, 1960). Dies erfolgt hauptsächlich auf dem Blutwege. Die direkte Diffusion zwischen den Vierteln ist daran nur geringfügig beteiligt (KÄSTLI, 1963; HAUKE, 1965).

Zur Bekämpfung der subklinischen Mastitiden des Rindes wurde in letzter Zeit die verstärkte intramammäre Behandlung unmittelbar nach dem Trockenstellen bzw. in der Trockenzeit empfohlen (SMITH et al., 1967; NEAVE et al., 1967). Vorzugsweise werden Präparate appliziert, die sich durch eine lange Verweildauer im trockenstehenden Euter auszeichnen. Unter diesen Präparaten mit Langzeitwirkung

finden immer häufiger Depot - Penicilline vom Typ des Benzathin - Penicillin G, des Benzathin - Cloxacillin und des Benzathin - Oxacillin Beachtung. Die beiden letzteren Substanzen sind halbsynthetische Penicilline und gehören zu der Gruppe der Isoxazolyl - Penicilline, die gegenüber Penicillinase sowie Säure weitgehend stabil sind.

Penicillin wurde ursprünglich aus *Penicillium notatum*, später aus natürlichen und vor allem aus künstlichen Mutanten von *Penicillium chrysogenum* gewonnen.

Die Grundsubstanz aller Penicilline ist die 6-Aminopenicillansäure, welche aus einem Thiazolidin - und einem β -Laktam - Ring besteht :



Bei den verschiedenen Penicillinen sind die R_1 -Seitenketten unterschiedlich, die Salze in R_2 beeinflussen Löslichkeit, Resorptionsgeschwindigkeit und Stabilität.

Die neueren halbsynthetischen Penicilline werden durch chemische Einführung der verschiedenen Alkylreste in R_1 der 6 - Aminopenicillansäure dargestellt. Der Kern, die 6 - APS, wird durch rein biologische Prozesse gewonnen.

Der Wirkungsbereich der halbsynthetischen Penicilline gegenüber grampositiven Keimen entspricht weitgehend dem des Penicillin G. Nur bei den Enterokokken besteht eine deutliche Wirkungslücke. Beträchtliche Unterschiede bestehen jedoch in der Wirksamkeit gegenüber penicillinasebildenden Staphylokokken, da sie ja im Gegensatz zu den biosynthetischen Penicillinen penicillinasefest sind (WALTER und HEILMEYER, 1965).

Ein Problem, welches immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist die Tatsache, daß vermehrt penicillinresistente Staphylokokkenstämme als Mastitiserreger auftreten (WILSON und DAVIDSON, 1961). Mit den biosynthetischen Penicillinen können diese Staphylokokken aufgrund ihrer Penicillinasebildung nicht angegangen werden. Seit der Entwicklung der halbsynthetischen Isoxazolyl-Penicilline liegen jedoch auch diese Stämme innerhalb des Wirkungsspektrums der Penicilline (SCHMID, 1969).

Die genannten drei Penicilline erreichen in Verbindung mit Benzathin infolge geringer Wasserlöslichkeit eine lange Verweildauer im trockenstehenden Euter. Bei der Mehrzahl der mit Benzathin-Cloxacillin unmittelbar nach dem Trockenstellen behandelten Kühe konnten 3 - 4 Wochen danach noch therapeutisch wirksame Konzentrationen des Antibiotikums im Trockensekret festgestellt werden (SCHMID, 1969). Eine Ausscheidung des Antibiotikums mit der Milch in der nachfolgenden Laktation wurde nicht beobachtet, wenn die Applikation des Präparates unmittelbar nach dem

Trockenstellen erfolgte (NEAVE et al., 1967). Zu gleichen Befunden bei entsprechender Applikation biosynthetischer Penicilline mit Langzeitwirkung kamen MOL und BAKKER - DE KOFF (1969) und MOL et al. (1970). AARRE und MADSEN (1970), MOL et al. (1970) sowie GEDEK und RICHTER (1972) wiesen daraufhin, daß bei späterer Behandlung in der Trockenzeit durchaus mit Antibiotika - Rückständen in der Milch zu rechnen ist. GEDEK und RICHTER (1972) überprüften, ob Kühe, die am Ende der Trockenzeit - zwei bis 39 Tage vor dem Abkalben - mit einem Benzathin - Penicillin G enthaltenden Präparat intramammär behandelt wurden, diesen Wirkstoff noch nach der fünftägigen Kolostralmilchperiode ausschieden. Sie empfahlen, die Behandlung mit diesem Präparat vier Wochen vor der zu erwartenden Kalbung abzuschließen, da sonst mit Antibiotika - Rückständen in der Kolostralmilch und in der Konsummilch gerechnet werden muß. Jede der innerhalb von 21 Tagen ante partum behandelten sechs Kühe schied das Depot - Penicillin auch noch nach der Kolostralmilchperiode von fünf Tagen aus. Über entsprechende Untersuchungen mit Isoxazolyl - Penicillinen liegen keine Angaben vor.

Die wirtschaftlichen Schäden durch Antibiotika - Rückstände in der Milch sind erheblich. Durch Hemmung der für die Käse-, Butter- und Joghurtproduktion benötigten Milchsäurebakterien wird die Fabrikation dieser Produkte entweder gestört oder verhindert (KUNDRAT, 1957 ; SCHLEIMINGER, 1958 ; WODSAK, 1959 ; WELZ, 1961 ; FRANK, 1963 ; HOBBIGER, 1965 ; LERCHE, 1966 ; SCHÖNHERR, 1967 u. a.). Der

finanzielle Schaden der milchverarbeitenden Industrie soll sich jährlich etwa auf 400 bis 500 Millionen DM belaufen (LIMMER, 1968).

Angaben über die Empfindlichkeit von molkereitech - nologisch wichtigen Mikroorganismen gegenüber den in der Milch vorkommenden Antibiotika machten NEAL und CALBERT (1955), DRAGON (1958), KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959), STORGARDS (1962), GALESLÖT und HASSING (1962), KRAAK und TOLLE (1967) u.a.

Der Genuß antibiotikahaltiger Milch kann für den Verbraucher eine Gefahr bedeuten. Besonders Penicillin kann bei Menschen, die durch eine vorherige Behandlung bereits sensibilisiert sind, starke Reaktionen wie Urtikaria, Ekzeme und auch schwere anaphylaktische Erscheinungen hervorrufen (KUSCHINSKY, 1960 ; OBIGER, 1962 u.a.). WELCH (1957) betonte, daß in den USA etwa 10 % der Gesamtbevölkerung penicillinempfindlich ist. Weiterhin wird die Möglichkeit diskutiert, daß durch den Genuß penicillin - haltiger Milch Alterationen der Darmflora mit Störung der Vitaminsynthese und Bildung pathogener, antibiotikaresistenter Bakterienstämme entstehen (DRAGON, 1958 ; STORGARDS, 1962 ; BECKER, 1966). Diese Annahme ist aber bisher nicht bewiesen worden.

C. Nachweis von Hemmstoffen in der Milch

Zahlreiche Autoren (OVERBY, 1954 ; STURM, 1955 ; DRAGON, 1958 ; KOTTER, TERPLAN und SCHULZ, 1959 ; STORGARDS, 1962 ; OBIGER, 1963 ; FRANK, 1965 ; KÖPKE, 1965 ; TERPLAN und ZAADHOF, 1967 und 1969 ; HAUKE, 1968 ; MAECK, 1969 ; BRUNN, 1971 u.a.) haben umfassende Darstellungen über Hemmstoffteste veröffentlicht. Sie unterscheiden zwischen chemischen und mikrobiologischen Methoden, außerdem werden noch Nachweise erwähnt, die auf Anfärbung von antibiotika-haltigen Mastitismitteln beruhen.

Der chemische Nachweis von Hemmstoffen in der Milch ist sehr exakt, kann aber nur gezielt eingesetzt werden. Man weist eine bestimmte Hemmsubstanz über die Identifizierung einer charakteristischen Komponente, wie z.B. des Chlors im Chloramphenicol nach (BRUNN, 1971). Aber bei der Vielfalt und der zum Teil ungeklärten Struktur der Hemmstoffe kommen diese Verfahren für Routineuntersuchungen nicht in Frage (STURM, 1955 ; REHM, 1961 ; FRANK, 1961 ; OBIGER, 1963 ; TERPLAN und ZAADHOF, 1967). STORGARDS (1962) gab exakte Darstellungen einiger chemischer Nachweismethoden. HAUKE (1965) wies daraufhin, daß der Nachweis von Sulfonamiden schlecht mit biologischen Methoden durchgeführt werden kann, da die gegen Antibiotika empfindlichen Testkeime gegen Sulfonamide nur gering oder gar nicht empfindlich sind. Sie werden chemisch nachgewiesen, weil sie in sauren Lösungen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd gelbe

Azofarbstoffe bilden.

Es ist vorgeschlagen worden, die Penicillinpräparate mit isotopischem Spurenmaterial zu versehen, wodurch Penicillin in Milch von behandelten Eutern mit großer Sicherheit nachgewiesen werden könnte. Das allerdings würde an die übliche Einrichtung einer Molkerei unangemessene Anforderungen stellen (STORGARDS, 1962).

Der Farbstoffmarkierung von Arzneimitteln zur Euterbehandlung wird seit den ersten Versuchen im Jahre 1950 besondere Beachtung geschenkt. Die antibiotikahaltige Milch soll dadurch gefärbt ausgeschieden und sofort kenntlich gemacht werden. STORGARDS (1962), OBIGER (1962), FRANK und SCHRAUDY (1965) sowie HOBBERGER (1966) haben sich mit diesem Problem näher befaßt. Sie betonten, daß hohe Anforderungen an die zur Markierung verwendeten Farbstoffe gestellt werden müssen, nämlich Unschädlichkeit für Mensch und Tier, Reizlosigkeit für das Eutergewebe, gleiche Haltbarkeit wie das Antibiotikum, keinerlei Einfluß auf die Wirksamkeit des Präparates, synchrone Ausscheidungsdauer, intensive Färbekraft und keine Ablagerungen im Fleisch von mit farbstoffhaltiger Milch gefütterten Tieren. Das größte Problem bei diesen Nachweisverfahren ist das schnelle Nachlassen der Färbekraft mit der Verdünnung durch Milch.

D. Mikrobiologischer Nachweis von Antibiotika - Rückständen

Die mikrobiologischen Nachweismethoden beruhen auf der besonderen Empfindlichkeit einiger Mikroorganismen gegenüber Hemmstoffen. Sie benützen als sichtbares Zeichen das Ausbleiben der Vermehrung von Testkeimen oder den Ausfall spezifischer Stoffwechselleistungen (FRANK, 1965). Neben der eigentlichen Kontrolle des Wachstums werden zur Feststellung der Keimvermehrung auch unterschiedliche Fähigkeiten der verschiedenen Reaktionssysteme, wie Säuerungs- und Reduktionsvermögen, Koagulationsfähigkeit und Glukosevergärung unter Gasbildung angewendet (MAECK, 1969). Diese Tests erlauben zwar keine Differenzierung der einzelnen Hemmsubstanzen, zeigen aber in relativ kurzer Zeit Hemmstoffe an.

TERPLAN und ZAADHOF (1967) unterscheiden zwischen vier biologischen Nachweismethoden :

1. Agardiffusionsverfahren
2. Nährkartonsporenverfahren
3. Säuerungs- und Reduktionsverfahren
4. Mikroskopische Verfahren

Zahlreiche Autoren haben die einzelnen Hemmstoffteste immer wieder abgewandelt und vereinfacht. Die Meinungen der Untersucher über die Wertigkeit verschiedener Nachweismethoden gehen stark auseinander.

1. Agardiffusionsverfahren

Bei diesen Verfahren unterscheidet man zwischen dem Agar-lochtest, dem Zylindertest und dem Papierblättchentest (KLEIN, 1957).

Beim Lochtest werden aus dem mit Testkeimen beimpften Nährboden Löcher ausgestanzt, in die die zu untersuchenden Proben verbracht werden. Ebenso kann man kleine Zylinder aus Metall, Glas oder Kunststoff auf den Agar setzen und mit Milch beschicken. Beim Papierblättchentest werden saugfähige Papierblättchen in die zu prüfende Milch getaucht und dann auf den Agar gelegt. Die so beschickten Agarplatten werden anschließend bebrütet. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen bildet sich um das Loch, den Zylinder oder das Blättchen eine klare, durchsichtige Hemmzone, die sich scharf von der übrigen, gleichmäßig mit den Testkeimen bewachsenen Agarfläche abgrenzt (BRUNN, 1971). Manche Autoren empfehlen vor der Bebrütung eine 1 - 4 stündige Aufbewahrung der Agarplatten im Kühlschrank, um die Diffusion eines eventuell vorhandenen Hemmstoffes in den Agar zu ermöglichen (MAECK, 1969).

Die Agardiffusionsverfahren sind vielfältig variiert worden, sei es durch die Auswahl verschiedener Testkeime (z.B. *Bac. subtilis* oder *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*) oder durch unterschiedliche technische Ausstattung und Ausführung. Sie sind zuverlässige Antibiotikatestes, aber für die tägliche Milchuntersuchung in den

Molkereien relativ arbeitsaufwendig (FRANK, 1963).

KLEIN (1957) faßt kurz die Vor- und Nachteile der Agardiffusionsteste zusammen. Die Vorteile sind :

1. Relative Unempfindlichkeit gegen Kontamination
2. Interpolierbare Einzelwerte
3. Geringe Mengen an Testflüssigkeit
4. Einfache Technik
5. Schnelles Erkennen von Störungsfaktoren (Parallelität von Standard- und Testkurve als zusätzliche Kontrolle)

Als Nachteile können die folgenden Punkte angesehen werden:

1. Die Ausrüstung ist aufwendiger als bei anderen Testen
2. Die Empfindlichkeit ist geringer

a) Agardiffusionsverfahren mit *Bac. subtilis*

Vielfach wird *Bac. subtilis* als der geeignetste Testkeim beim Agardiffusionsverfahren gehalten. DIEMAIR und RÖDDER (1959/60) sowie KLEIN (1957) beschreiben die Herstellung einer Sporensuspension von *Bac. subtilis* für Testzwecke. PICHNARCIK, WENZEL und GIBKE (1969) bevorzugen *Bac. subtilis* besonders wegen seiner großen Penicillinempfindlichkeit gegenüber anderen Testkeimen.

KOSIKOWSKY und LEDFORD (1960) haben den sogenannten Phasenumkehrtest erarbeitet. Dabei werden die Sporen von

Bac. subtilis in ein Substrat gegeben, das Agar, Kochsalz und Wasser, aber keine Nährstoffe enthält. Diese gelangen erst mit den in die zu untersuchende Milch getauchten Nährkartonscheibchen auf den Agar. HAMANN und BLÜMEL (1967) ziehen dieses Nachweisverfahren dem Methylenblau - Reduktionstest vor.

a) Nachweisgrenzen

Die Angaben der einzelnen Verfasser über die Nachweisgrenzen von Penicillin mit Bac. subtilis als Testkeim variieren sehr stark. Sie liegen zwischen 0,05 I.E. Penicillin /ml und 0,001 /ml (KLEIN, 1957; SEELMANN und Obiger, 1958; LERCHE, 1966; BRUNN, 1971 u.a.).

b) Agardiffusionsverfahren mit Bac. stearothermophilus var. calidolactis

Bac. stearothermophilus var. calidolactis wird seit etwa zehn Jahren ebenfalls als Testkeim im Agardiffusionstest verwendet. MODESTO YAO und WALKER (1967) beschrieben ebenso wie THOMPSON und THAMES (1967) eine Methode für Wachstum und Gewinnung von Sporen dieses Keimes. TERPLAN und ZAADHOF (1969) halten Bac. stearothermophilus var. calidolactis dem Bac. subtilis für überlegen, da er noch penicillinempfindlicher ist und die Ergebnisse bereits nach kurzer Zeit - etwa drei Stunden - vorliegen, während

die Bebrütung bei *Bac. subtilis* etwa 18 Stunden dauert (KLEIN, 1957). Auch Verunreinigungen des Nährbodens spielen bei der hohen Bebrütungstemperatur von 70° C keine Rolle.

GALESLOT und HASSING (1962) beschrieben einen Agardiffusionsblättchentest mit dem *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim. IGARASHI et al. (1960) haben zwei verschiedene Schnellteste zum Hemmstoffnachweis in Milch mit diesem Keim entwickelt. Eine Methode wurde dabei als Filterscheibentest auf einem mit der Testkultur beimpften Trypsinase-Hefeextrakt-Glukose-Agar ausgearbeitet. Die andere Methode wurde als Reduktionstest mit TTC im flüssigen Medium durchgeführt.

Ebenfalls zu den Agardiffusionsverfahren kann man den von KRAACK und TOLLE (1967 und 1969) entwickelten Brillantschwarz - Reduktionstest zählen. Die Autoren verwenden *Bac. stearothermophilus* als Testkeim, den sie zusammen mit dem Indikator Brillantschwarz dem Nährboden zusetzen. Verfärbt sich der Agar nicht, so kann mit dem Vorhandensein von Hemmstoffen gerechnet werden.

4) Nachweisgrenzen

Bei diesem Testkeim schwanken die Angaben der Untersucher über die Nachweisgrenze von Penicillin gering. Es werden Werte von 0,0025 bis 0,005 I.E. Penicillin / ml angegeben (GALESLOT und HASSING, 1962 ; STORGARDS, 1962 ; KRAACK und TOLLE, 1967 und 1969 ; MAECK, 1969 u.a.).

2. Weitere Verfahren

PALMER und KOSIKOWSKY (1967) entwickelten den Phasenumkehrtest zum sogenannten Nährkarton - Sporenverfahren. Mit Pepton, Saccharose, TTC und Sporen von *Bac. subtilis* getränkte Papierscheibchen werden gefriergetrocknet und vor Gebrauch zehn Tage bei + 5° C gelagert. Die Scheibchen werden in enge, in einem Plastiksatz befindliche Vertiefungen eingelegt, mit einer geringen Menge der zu untersuchenden Milch überschichtet und bei 40° C im Wasserbad bebrütet. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen unterbleibt die TTC - Reduktion zum roten Formazan. Innerhalb von 4 - 6 Stunden können mit dieser Methode 0,002 I.E. Penicillin / ml nachgewiesen werden. Ein besonderer Vorteil ist die lange Lagerfähigkeit der Papierscheibchen (12 Monate).

Bei den Säuerungs- und Reduktionsverfahren wird die zu untersuchende Milch mit einer Testkultur (Säurewecker, Joghurt) beimpft und bebrütet. Die Säuerung wird mit derjenigen einer hemmstofffreien Kontrollprobe verglichen bzw. es wird die Differenz zwischen der Reduktionszeit der verdächtigen Milch und der Vergleichsprobe ermittelt. Die Säuerungs- und Reduktionsteste sind besonders für den Gebrauch in den Molkereien geeignet (FLEISCHMANN, 1954 ; KOTTER, TERPLAN und SCHULZ, 1959 ; KIERMEIER, 1961 ; RACKOW und WELZ, 1964 ; FRÄNK, 1965 ; GROSSKLAUS und LEVETZOW, 1966 ; LANG, 1967). WODSAK (1959) empfiehlt

Sc. thermophilus als Testkeim bei der Säuerungsprobe, während FLEISCHMANN (1954) und DRAGON (1958) die Joghurtkultur für geeigneter halten, da sie Penicillin gegenüber empfindlicher ist, die Ergebnisse schneller vorliegen (in zwei Stunden) und sie außerdem in jeder Molkerei vorhanden ist. Die Säuerung der Milch nach der Bebrütung wird durch Titration mit 4/n Natronlauge nach Soxhlet - Henkel bestimmt. Mit dieser Methode konnten 0,02 I.E. Penicillin nachgewiesen werden. Mittlerweile haben sich neben der Titration die Verfahren durchgesetzt, bei denen mit Hilfe eines Indikators der Verlauf der Säuerung kontrolliert wird. RACKOW und WELZ (1964) haben sich mit der Säuerungsprobe mit Joghurt und Lackmus als Indikator beschäftigt. Sie halten sie ebenso wie SCHLEIMINGER (1958) und LANG (1967) am geeignetsten für die Routineuntersuchungen in den Molkereien, während für FLEISCHMANN (1954) und REHM (1961) dieses Verfahren zwar einfach, aber nicht schnell genug ist.

NEAL und CALBERT (1955) haben einen TTC - Reduktions-test entwickelt. 2,3,5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist eine fast farblose Substanz, die durch Reduktion in das rote, wasserunlösliche Formazan übergeht. KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959) haben die Empfindlichkeit des TTC - Testes verbessert, indem sie statt des vorher benutzten Sc. thermophilus eine Joghurtkultur als Testkeim verwendeten. SCHMIDT (1962), SCHÖNHERR (1967) sowie GROSSKLAUS und LEVETZOW (1966) halten den TTC- Test eben-

falls für besonders geeignet, während KIERMEIER (1961) und OBIGER (1963) dem Methylenblau - Reduktionstest den Vorzug geben.

Die Angaben über die Empfindlichkeit der einzelnen Verfahren sind wegen Verwendung unterschiedlicher Testkeime und Indikatoren sehr verschieden. Ebenso wie die nicht einheitliche Technik kann auch das Alter und die Keimdichte der Testsubstanz einen Einfluß auf die Empfindlichkeit des Nachweises haben. Die Joghurtkulturen sollten stets frisch sein, und vor Gebrauch ebenso wie die Lackmuspulver gut geschüttelt werden, damit Fehlerquellen ausgeschaltet werden (RACKOW und WELZ, 1964).

Bereits 0,001 I.E. Penicillin / ml können morphologische Veränderungen bestimmter Streptokokken verursachen (KIERMEIER, 1961). LISKA (1960) und LANG (1967) beschrieben Methoden zum mikroskopischen Nachweis von Hemmstoffen. Die verdächtigen Proben werden mit Säureweckerkulturen beimpft und bebrütet, dann werden gefärbte Ausstriche angefertigt, und auf morphologische Veränderungen im Vergleich zu Kontrollproben mit hemmstofffreier Milch untersucht.

Die Unterscheidung von Penicillin gegenüber anderen Hemmstoffen ist mit dem Ferment Penicillinase möglich, das Penicillin in die antibiotisch nicht wirksame Penicilloinsäure umwandelt (WODSAK, 1959 ; KRAACK und TOLLE, 1967), 0,5 I.E. Penicillinase heben die Wirkung von 1 I.E. Penicillin auf (FLEISCHMANN, 1954). Eine weitere Unter-

scheidungsmöglichkeit ist der Glukose-Vergärungstest nach Kluyver-Mossel. Hefen sprechen nicht auf Antibiotika an. Wenn also bei diesem Verfahren eine Hemmwirkung festgestellt wird, so ist das mit Sicherheit nicht auf Antibiotikawirkung zurückzuführen (KOTTER, TERPLAN und SCHULZ, 1959).

E. Inaktivierung von Antibiotika in der Milch

Über den Einfluß der in der Milchwirtschaft üblichen Erhitzung der Milch auf die Wirksamkeit der Antibiotika bestehen unterschiedliche Auffassungen. Sowohl PLJACHIEN (1951) wie THOME (1953), OVERBY (1954), HOBBIER (1965) und HAUKE (1968) stellten fest, daß die Wirkung der Antibiotika durch die Hitzebehandlung in den Molkereien nicht beeinträchtigt wird. BECKER (1966) dagegen, der die Anlieferungsmilch mit Penicillin und Streptomycin versetzte und einer amtlich zugelassenen Kurzzeiterhitzung unterwarf, kam zu dem Ergebnis, daß 80 % des Penicillins und etwa 90 % des Streptomycins zerstört wurden. LANG (1967) prüfte mittels Säuerungs- und Reduktionsmethoden, ob durch Hitze einwirkung von fünf Minuten bei 80 bzw. 85° C eine Inaktivierung der der Milch zugesetzten Hemmstoffe eintrat. Er ermittelte keine Schädigung der Antibiotika Penicillin, Streptomycin, Chlortetracyclin und Chloramphenicol. HAUKE (1968) setzte antibiotikahaltige Milch einer Hitzebehandlung von 71 - 86° C für die Dauer von 10 bis 100 Sekunden aus. Er konnte keine Verminderung des Penicillingehaltes erkennen, während Streptomycin und Oxytetra-

cyclin eine etwas geringere Hitzestabilität aufwiesen. Nach OVERBY (1954) wurde durch eine Erhitzung der Milch von 10 Minuten auf 115° C eine Zerstörung des Penicillins erreicht, während SCHÖNHERR (1967) erst bei 120° C eine Verminderung des Antibiotikums um 30 - 60 % feststellte.

F. Natürliche Hemmstoffe in der Milch

Die ersten Angaben über die Bakterizidie der Milch stammen von FOKKER (1890), welcher im Jahre 1890 beobachtete, daß sich in frischer Ziegenmilch Milchsäurebakterien wider Erwarten nicht vermehrten, sondern abstarben.

Die natürliche Bakterizidie wird in erster Linie dem Laktenin zugeschrieben, das sich aus einem Gemisch verschiedener, anscheinend eiweißartiger Körper zusammensetzt. AUCLAIR und HIRSCH (1953) unterscheiden zwischen dem Laktenin 1, das vor allem im Kolostrum vorkommt, und dem Laktenin 2, welches von PORTMANN und AUCLAIR (1959) als identisch mit der Peroxidase erkannt wurde. Laktenin wirkt mehr bakteriostatisch als bakterizid und ist nur in Gegenwart von molekularem Sauerstoff wirksam (AUCLAIR und HIRSCH, 1953). Es wird vermutlich im Eutergewebe gebildet und gelangt dann in die Milch (WAGNER, 1965).

Auch Hormone, Fermente und Leukozyten sollen einen bakterienhemmenden Einfluß ausüben. Ebenfalls können durch die Silagefütterung Hemmwirkungen entstehen (SEELEMANN und OBIGER, 1958). Milch mit erhöhtem Keimgehalt weist

eine natürliche Hemmung auf, die durch bestimmte Bakterien verursacht wird. *Streptococcus lactis* bildet z.B. das Nisin und *Streptococcus cremoris* einen dem Nisin ähnlichen Hemmstoff, das Diplococcin (OVERBY, 1954 ; MEEWES und MILOSEVIC, 1954 ; SEELEMAN, 1961 ; OBIGER, 1963).

Wie die Inhibine, Substanzen, die in frisch ermolkenner Milch antibakteriell wirken (DOLD, 1934), wird auch das Laktenin irreversibel durch Hitze inaktiviert. Circa fünf Minuten langes Erhitzen auf 80 - 82° C oder kurzes Erhitzen auf 100° C ist dazu notwendig (WAGNER, 1965 ; LERCHE, 1966). SINELL (1964) weist auf Untersuchungsergebnisse hin, nach denen bei 37° C die natürliche antibiotische Aktivität der Milch nach zwei bis drei Stunden verschwindet, bei 4° C aber über 16 Stunden und im tiefgefrorenen Material tagelang vorhanden bleibt. Bei mittleren Temperaturen ist die natürliche Aktivität nicht vor acht Stunden nach dem Melken verschwunden, läßt sich aber bei vorher durch Erhitzen inaktiverter Milch durch 5 % Rohmilchzusatz reaktivieren. Laktenin verliert seine Aktivität bei einem niedrigeren pH-Wert als 3,26 und einem höheren als 10,24.

BRUNSCHWILER (1961) hat bei seinen Versuchen festgestellt, daß der Hemmeffekt frischer Rohmilch im Agarlochtest einem Penicillingehalt von 0,5 I.E. entsprechen kann. SILVERMANN und KOSIKOWSKY (1952) prüften ebenfalls die natürliche Hemmwirkung roher Milch gegenüber einigen Testorganismen und ermittelten *Bac. subtilis* als geeigneten

Testkeim. Die Hemmzonen waren zwar klein, aber klar und deutlich.

Hemmende Substanzen gegenüber *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* sind von BUSTA (1966) und ASHTON und BUSTA (1968) näher untersucht worden. BUSTA (1966) stellte fest, daß die Milchkomponente, die bestimmte Stämme von *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* hemmt, in der Kasein - Fraktion vorhanden ist.

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

A. Material

1. Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden folgende Antibiotika verwendet :

Stapenor Natrium gereinigt (BAYER, Leverkusen),

Registriernummer 107/70,

Penicillin G - Kalium (BAYER, Leverkusen),

Registriernummer 718/70,

Streptomycinsulfat (BAYER, Leverkusen),

Registriernummer 708/70,

Chloramphenicol (BAYER, Leverkusen),

Registriernummer 6003/71 sowie

Terramycin (PFIZER GmbH),

Registriernummer 9195.

Für die Untersuchungen wurden die Lösungen der verschiedenen Antibiotika stets frisch hergestellt.

2. Testkeime

Als Testkeime wurden *Bac. subtilis* (ATCC 6633), *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953) und *Bac. cereus* (ATCC 11778) herangezogen.

3. Verdünnungsmedien

Als Verdünnungsmedien dienten m/15-Phosphatpuffer(pH= 6,5 und 7,8) sowie sterile Magermilch und Rohmilch.

Die m/15-Phosphatpuffer mit pH 6,5 und 7,8 wurden nicht länger als 14 Tage nach der Herstellung benutzt.

Der m/15-Phosphatpuffer mit pH 7,8 fand ausschließ -
lich für die Verdünnung von Streptomycinsulfat Verwendung.

4. Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien waren Antibiotic Medium 1 (Difco), Antibiotic Medium 2, Nutrient Agar(Oxoid) und Brain Heart Infusion Agar(Difco).

5. Präparat für die intrazisternale Applikation

Das für die intramammäre Applikation in der Trockenzeit verwendete Präparat stammt von BAYER, Leverkusen und enthält pro 7,5 g Salbe, der pro Euterviertel instillierten Menge, 800 mg Stapenorsäure in Form des NND-Salzes und 200 mg Stapenorsäure in Form des Natriummonohydrats. Stapenor ist ein Handelsname für das Isoxazolyl-Penicillin Oxacillin.

6. Milchproben

Zum Nachweis von Oxacillin in der Milch der während der

Trockenzeit behandelten 15 Kühe standen das 11., 15. und 20. Gesamtgemelk post partum zur Verfügung.

Die Kolostralmilchproben und Mastitissekrete sowie die übrigen Milchproben stammten von Kühen, die nach Aussagen der Tierbesitzer innerhalb von zwei Monaten vor der Entnahme nicht mit Antibiotika und Chemotherapeutika behandelt worden waren. Die Kolostralmilchproben und Mastitissekrete waren Anfangsgemelke.

B. Methodik

1. Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtestes mit *Bac. subtilis*

Die Herstellung der Sporensuspension erfolgte nach der Methode von KLEIN(1957). Eine in Nährbouillon gewachsene frische Kultur von *Bac. subtilis* ATCC 6633 wurde mit Hilfe eines Drigalskispatels auf 30 Agarplatten (Nutrient Agar, Oxoid) verimpft. Danach kamen die Platten für 12 Tage bei 37° C in den Brutschrank. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. abgeschwemmt. Die Keime wurden nach jeweiligem Zentrifugieren bei 3000 U / min fünfmal mit Aqua dest. gewaschen. Das Sediment wurde in 150 ml Aqua dest. aufgenommen, gut durchmischt und 30 Minuten lang im Wasserbad bei 80° C gehalten, um die vegetativen Formen abzutöten. Zur Vermeidung der Verklumpung von Sporen wurde die Suspension 20 Sekunden mittels Ultra - Turrax bei 20 000

U / min durchmischt.

Die Sporensuspension wurde in einer Demeter - Flasche mit sterilen Glasperlen bei + 4° C aufbewahrt.

Die Dichte wurde mit dem Koch' schen Keimzählungsverfahren bestimmt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente 0,85%ige sterile Kochsalzlösung, als Nährboden Antibiotic Medium 1 (Difco). 2×10^9 Sporen wurden ermittelt. Die Zählung wurde im Abstand von einem Monat wiederholt. Ein Absinken der Sporendichte konnte während der Dauer der eigenen Versuche nicht beobachtet werden. Die Sporensuspension wurde vor den einzelnen Versuchen stets soweit verdünnt, daß der Sporengehalt des Agars 7500 / ml betrug.

Für den Lochtest wurden plangeschliffene, sterilisierte Glasplatten (22 x 46 cm) auf einen vorher mit der Wasserwaage ausgerichteten Tisch gelegt und darauf plangeschliffene, sterile Rahmen aus Plexiglas (19 x 19 cm Innendurchmesser), die vorher durch Formalinbehandlung keimfrei gemacht wurden. In diese Rahmen wurde der auf pH 6,5 eingestellte und circa 70° C heiße Agar ausgegossen, nachdem er mit der vorgeschriebenen Menge Sporen versetzt worden war. Pro Rahmen wurden 80 ml Agar ausgegossen. Die Schichtdicke des Agars betrug 2,12 mm. Die beiden Rahmen wurden jeweils mit Filterpapier und einer Glasscheibe bedeckt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden die Agarplatten für etwa zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt.

Mit Hilfe einer Schablone wurden in regelmäßigen Abständen mittels eines Korkbohrers (Durchmesser 13 mm)

12 Löcher ausgestanzt, und die Agarstücke mit einer ab - geflammten Öse herausgehoben. Jeweils 0,2 ml Flüssigkeit wurden pro Loch einpipettiert. Danach wurden die Platten 16 - 20 Stunden bei 37° C bebrütet.

2. Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtestes mit
Bac. stearothermophilus var. *calidolactis*

Zur Gewinnung von Keimen des *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* wurde der Teststamm C 953 auf Schrägagar - röhrchen mit Brain Heart Infusion Agar (Difco) überimpft und circa 36 Stunden bei 55° C im Wasserbad bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen mit je 3 ml 0,85%iger steriler Kochsalzlösung abgeschwemmt.

Die Keimdichte der Suspension wurde mit dem Koch'schen Keimzählungsverfahren bestimmt. Sie lag stets zwischen $4,4 \times 10^7$ und $6,2 \times 10^8$ Keimen / ml.

Die Suspension wurde in einer Demeter - Flasche bei + 4 bis + 6° C aufbewahrt. Die Testkeime wurden so rasch wie möglich nach der Gewinnung mit dem Testagar vermischt und in Petrischalen ausgegossen.

Für den Lochtest wurde Antibiotic Medium 1 mit einer Einsaat von 1×10^5 Keimen pro ml in sterile Petrischalen aus Glas gegossen. Da für diesen Zweck größere Petrischalen als üblich verwendet wurden, waren pro Schale 17,4 ml Nährboden nötig, um die gewünschte Schichtdicke von 2,12mm zu erreichen. Jeweils 5 - 6 Löcher wurden pro Petri -

schale ausgestanzt und mit jeweils 0,2 ml Flüssigkeit beschickt. Dann wurden die Schalen etwa 8 Stunden lang bei 70° C und hoher Luftfeuchtigkeit bebrütet.

3. Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtestes mit *Bac. cereus*.

Der Lochtest mittels *Bac. cereus* wurde mit einigen Ausnahmen in der gleichen Weise durchgeführt wie der mittels *Bac. subtilis*. Lediglich die Einsaat der Testsporen lag bei 1×10^6 / ml Agar, die Bebrütungszeit betrug nur 12 - 16 Stunden und als Nährmedium fand Antibiotic Medium 2 Verwendung. Die Methodik der Gewinnung der Sporen von *Bac. cereus* entsprach der von *Bac. subtilis*.

4. Herstellung von Antibiotika - Standards.

Gleichzeitig mit der zu testenden Flüssigkeit wurde eine zweite Serie von Löchern mit einer Antibiotika - Standardlösung beschickt, um die Hemmwirkung des zu untersuchenden Materials mit der eines bekannten Antibiotikums vergleichen zu können.

Bei der Herstellung des als Bezugssystems dienenden Standards wurde von einer Lösung von m/15-Phosphatpuffer mit dem pH-Wert 6,5 ausgegangen, die eine bestimmte Menge eines Antibiotikums, z.B. 1 I.E. Penicillin G - Kalium, enthielt.

Von der Ausgangslösung wurde mittels m/15-Phosphat - puffer eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Stufen 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Der Standard mußte bei jeder neuen Charge von Agar - platten erneut angesetzt werden, da er immer nur für einen Versuch als Bezugssystem dienen konnte.

Von der zu testenden Milchprobe wurde ebenfalls eine entsprechende geometrische Verdünnungsreihe angelegt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente entweder der oben beschriebene Puffer oder sterile Magermilch. Wenn sterile Magermilch benutzt wurde, mußte der Standard ebenfalls mit dieser Milch angesetzt werden, um gleiche Bedingungen zu erreichen.

5. Auswertung der Ergebnisse

Nach einer Bebrütungszeit von 16 - 20 (*Bac.subtilis*), bzw. 8 (*Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*), bzw. 12 - 16 Stunden (*Bac.cereus*), konnte man die Ergebnisse auf den Platten ablesen. Vorhandene Hemmhöfe wurden mit Hilfe einer Schublehre ausgemessen. Hatten sich am Rand der Hemmhöfe Oberflächenkolonien gebildet, ließen sich durch vorsichtiges Abwischen mit nassem Zellstoff scharf begrenzte Hemmhöfe erkennen.

6. Intrazisternale Applikation von Oxacillin

Pro Euterviertel wurden bei 15 trockenstehenden Kühen nach Reinigung und Desinfektion der Zitzenkuppe 7,5 g Oxacillin - Salbe, eine dem Inhalt eines einzelnen Injektors entsprechende Menge, intrazisternal appliziert. Die Versuchskühe waren innerhalb von zwei Monaten vor dieser Applikation weder intrazisternal noch auf anderem Wege mit Antibiotika bzw. Chemotherapeutika behandelt worden.

7. Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe

Die nach der Trockenzeitbehandlung entnommenen Milchproben, die Kolostralmilchproben und die Mastitissekrete wurden unmittelbar nach der Entnahme gekühlt, kühl aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden bei mindestens -18°C tiefgefroren. Spätestens innerhalb von vier Wochen nach der Probenentnahme wurden die Proben aufgetaut und auf das Vorkommen von Hemmstoffen mittels Agardiffusionsverfahren untersucht.

C. Versuche und Versuchsergebnisse

1. Streuung der Hemmhofgrößen und Aufbewahrungsdauer des Testagars

Um einen Überblick über die Streuung der Hemmhofgrößen auf Testagar, der in besonderer Weise auf Glasplatten aufgebracht war, zu bekommen, wurde von einer Penicillin G - Kalium - Standardlösung, die genau 1 I.E. Penicillin pro ml enthielt, eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Stufen 1/1 bis 1/128 angelegt. Die Standardlösung wurde unmittelbar vor dem Versuch angesetzt und für die Dauer des Versuchs von 72 Stunden bei -20° C aufbewahrt. Mit der gleichen Standardlösung wurden die vier Agarchargen A bis D zu verschiedenen Zeitpunkten im Doppelansatz beschickt. Der Lochtest wurde mit *Bac. subtilis* als Testkeim durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Streuung der Ergebnisse innerhalb der gleichen Charge bei unterschiedlicher Aufbewahrungsdauer nicht signifikant ist und daß geringe Differenzen der Hemmhofgrößen bei unterschiedlichen Testagar - Chargen bestehen können (Tabelle 1). Die angewendete Methodik zum Nachweis von Antibiotika führt zu reproduzierbaren Ergebnissen, wenn innerhalb einer Zeitspanne von drei Tagen mit der gleichen Agarcharge gearbeitet wird.

Tabelle 1

Hemmhofgrößen bei Verdünnungsreihen mit Penicillin G -
Kalium in Phosphatpuffer nach unterschiedlicher Auf -
bewahrungsdauer des Agars

Nährboden Charge	Aufbewahrung des Nährbodens in Stunden	+ Hemmhofgrößen der Verdünnungsstufen							
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
A	4	10,5	9,2	7,8	6,6	5,5	4,3	2,9	2,1
A	24	10,8	9,0	8,0	7,0	5,7	4,0	3,0	2,1
A	48	10,6	9,3	7,9	6,8	5,3	3,8	3,1	2,2
A	72	10,8	9,0	7,9	7,0	5,4	3,8	3,0	2,2
B	4	11,1	9,8	8,8	6,8	6,1	4,4	2,8	1,8
B	24	11,1	10,1	8,3	6,6	5,8	4,1	3,0	1,7
B	48	11,0	9,8	8,0	6,6	5,0	3,8	2,8	1,5
B	72	11,2	10,0	8,5	6,7	5,3	4,0	3,0	1,8
C	4	10,6	9,0	7,5	6,1	5,0	3,8	3,0	1,2
C	24	10,8	9,0	7,1	5,8	5,0	3,9	2,9	1,5
C	48	10,9	10,0	7,8	6,8	5,3	4,0	2,8	1,3
C	72	10,7	9,8	7,6	6,2	5,0	4,0	3,0	1,5

Fortsetzung Tabelle 1

(1)

D	4	11,1	9,1	8,0	6,8	5,3	4,0	3,1	2,1
D	24	11,0	9,3	7,9	6,9	5,8	4,8	3,2	2,5
D	48	11,0	10,0	8,0	6,9	5,4	4,0	2,9	2,0
D	72	11,0	9,5	8,0	6,7	5,5	4,3	2,9	2,2

Zeichenerklärung:

+ Wachstumsfreie Zone in mm, vom Lochrand bis zum Bakterienrasen gemessen

Die in dieser Tabelle angegebenen Werte der Hemmhofgrößen sind jeweils die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen.

2. Nachweisgrenze von Penicillin G - Kalium in Rohmilch und sterilisierter Magermilch

Da in der Literatur die Nachweisgrenze für Penicillin unterschiedlich hoch angegeben wird, wurde die Nachweisgrenze von Penicillin G - Kalium in Milch unter den besonderen Bedingungen des beschriebenen Lochtestes mit *Bac. subtilis* (ATCC 6633) in unerhitzter Vollmilch und in durch Erhitzen sterilisierter Magermilch als Verdünnungsmedien untersucht. Für die Versuche wurden stets frisch

angesetzte Lösungen des Antibiotikums verwendet.

Vom Antibiotikum wurde dreimal die gleiche Menge abgewogen und insgesamt 12 verschiedene Roh - und Magermilchproben auf je 1 I.E. Penicillin / ml eingestellt. Sieben Verdünnungsstufen (geometrische Verdünnungsreihe) pro Ansatz wurden von einer I.E. ausgehend angelegt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Alle Milchproben wurden vorher auf Hemmstoffgehalt untersucht. Sie zeigten keinerlei Hemmwirkung.

Tabelle 2

Nachweisgrenze für Penicillin G - Kalium bei Anwendung
verschiedener Verdünnungsmedien

Penicillin Charge	Verdünnungs - medium Charge	Nachweisgrenze für Penicillin in I.E. / ml	
P ₁	M ₁	0,03	0,03
P ₁	M ₂	0,015	0,03
P ₁	R ₁	0,06	0,06
P ₁	R ₂	0,03	0,06
P ₂	M ₃	0,03	0,03
P ₂	M ₄	0,03	0,03
P ₂	R ₃	0,06	0,06
P ₂	R ₄	0,06	0,06
P ₃	M ₅	0,03	0,015
P ₃	M ₆	0,03	0,03
P ₃	R ₅	0,06	0,06
P ₃	R ₆	0,06	0,06

Zeichenerklärung:

P = Penicillin

M = Magermilch

R = Rohmilch

1 - 6 = sechs verschiedene
Chargen

Aus der Tabelle geht hervor, daß der Nachweis von Penicillin G - Kalium bei Verwendung von Magermilch als Verdünnungsmittel mit 0,03 I.E. / ml empfindlicher war als mit Rohmilch, in der das Antibiotikum nur bis zu 0,06 I.E./ ml nachgewiesen werden konnte.

3. Nachweisgrenzen für Oxacillin und andere Antibiotika im Lochtest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*

Zunächst war die Empfindlichkeit des Nachweises von Oxacillin im Lochtest mit *Bac. subtilis* und *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zu prüfen. In sechs unabhängigen Ansätzen wurden verschiedene Verdünnungsstufen (geometrische Verdünnungsreihe) von Oxacillin in m/15-Phosphatpuffer (pH 6,5) gegenüber *Bac. subtilis* getestet. In fünf Fällen lag die Nachweisgrenze bei 0,125 μ g /ml, in einem Falle bei 0,25 μ g /ml. Dem gegenüber zeigt Tabelle 3, daß das im gleichen Puffer gelöste Oxacillin im Lochtest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* bis zu einer Konzentration von 0,015 g /ml nachgewiesen werden kann, so daß diesem Testkeim wegen seiner besonders hohen Empfindlichkeit gegenüber dem Isoxazolyl - Penicillin Oxacillin im Vergleich zu *Bac. subtilis* der Vorzug zu geben ist. Bei dieser Prüfung wurden auch noch Penicillin G - Kalium, Streptomycinsulfat, Chloramphenicol und Oxytetracyclin vergleichsweise mitgetestet (Tabelle 3). Bei Streptomycinsulfat war die Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeit

von der Art des Verdünnungsmediums beachtlich. Die in Tabelle 3 angegebenen Werte sind auf jeweils vier unabhängige Ansätze mit Doppelbestimmungen zurückzuführen. Auch die Empfindlichkeit des Nachweises von Penicillin G - Kalium liegt mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* um das Zehnfache höher als mit *Bac. subtilis* (Tabelle 2 und 3).

Tabelle 3

Nachweisgrenzen verschiedener Antibiotika im Lochtest mit
Bac. stearotheophilus var. calidolactis

Antibiotikum	Verdünnungsmedium	Nachweisgrenze in I.E. (Peni - cillin) bzw. µg g			
		1	2	3	4
Oxacillin	Phosphatpuffer	0,015	0,015	0,03	0,015
		0,015	0,015	0,03	0,015
	ster. Magermilch	0,03	0,015	0,03	0,03
		0,03	0,03	0,03	0,03
Penicillin G - Kalium	Phosphatpuffer	0,003	0,003	0,003	0,007
		0,003	0,003	0,003	0,007
	ster. Magermilch	0,003	0,003	0,007	0,003
		0,003	0,003	0,003	0,007
Streptomy - cinsulfat	Phosphatpuffer	1	1	1	1
		1	1	1	1
	ster. Magermilch	4	4	4	4
		4	4	4	4
Chloramphenicol	Phosphatpuffer	1	1	1	1
		1	1	1	1
	ster. Magermilch	1	0,5	1	1
		1	0,5	1	0,5
Oxytetra - cyclin	Phosphatpuffer	0,3	0,3	0,3	0,3
		0,3	0,15	0,3	0,15
	ster. Magermilch	0,3	0,3	0,3	0,3
		0,3	0,3	0,3	0,3

4. Unspezifische Hemmung von Kolostrum gegenüber *Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* und *Bac. cereus*

In einem vierten Versuch wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Kolostralmilchproben von unbehandelten Kühen Hemmreaktionen im Agardiffusionsverfahren mit *Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* und *Bac. cereus* auslösen können. Die entsprechenden Ergebnisse mit 105 Kolostralmilchproben gibt Tabelle 4 wieder. 27 Tiere waren in die Untersuchungen einbezogen worden. Kolostralmilchproben vom 1., 2., 3., 4. und 5. Tag post partum wurden geprüft.

Positiv reagierten vier Kolostralmilchproben einer Kuh gegenüber *Bac. subtilis*, eine Probe einer weiteren Kuh gegenüber *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* und eine Probe einer dritten Kuh gegenüber *Bac. cereus*. Die Quote der $\pm$ - Reaktionen lag für *Bac. subtilis* bei 20,9 %, für *Bac. calidolactis* bei 14,2 % und bei *Bac. cereus* bei 9,5 %.

Tabelle 4

Sensibilität verschiedener Testkeime gegenüber Kolostrum -
tralmilchproben gesunder, unbehandelter Kühe

Tag nach dem Abkalben	Kolostrum aus dem Euterviertel	Hemmreaktion des Kolostrums gegenüber		
		Bac.subtilis (ATCC 6633)	Bac.calidolactis (C 953)	Bac.cereus (ATCC 11778)
1.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
1.	A	-	±	-
	B	-	-	-
	C	-	±	-
	D	-	±	-
1.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
1.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 4

(1)

1.	A	$\pm$	-	-
	B	$\pm$	-	-
	C	$\pm$	-	-
	D	$\pm$	-	-
2.	A	-	$\pm$	$\pm$
	B	-	+	-
	C	-	$\pm$	$\pm$
	D	-	$\pm$	-
2.	A	-	-	-
	B	-	$\pm$	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
2.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	$\pm$	-
	D	-	-	-
2.	A	-	$\pm$	-
	B	-	-	-
	C	-	$\pm$	-
	D	x	x	x

Fortsetzung Tabelle 4

(2)

2.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
3.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
3.	A	$\pm$	-	$\pm$
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
3.	A	-	-	$\pm$
	B	-	-	$\pm$
	C	-	-	$\pm$
	D	-	$\pm$	$\pm$
3.	A	$\pm$	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 4

(3)

3.	A	$\pm$	$\pm$	$+$
	B	$\pm$	-	-
	C	$\pm$	-	-
	D	$\pm$	-	-
3.	A	$\pm$	-	-
	B	$\pm$	-	-
	C	$\pm$	-	-
	D	$\pm$	$\pm$	-
3.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
4.	A	-	$\pm$	$\pm$
	B	-	$\pm$	$\pm$
	C	x	x	x
	D	-	-	$\pm$
4.	A	$\pm$	-	++
	B	$\pm$	-	-
	C	$\pm$	-	-
	D	$\pm$	-	-

Fortsetzung Tabelle 4

(4)

4.	A	$\pm$	-	-
	B	$\pm$	-	-
	C	$\pm$	-	-
	D	$\pm$	-	-
5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 4

(5)

5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
5.	A	+	-	-
	B	+	-	-
	C	+	-	-
	D	+++	-	-
5.	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	x	x	x

Zeichenerklärung:

- = keine Hemmreaktion erkennbar

± = kleiner, unscharfer Hemmhof < 1mm (vom Lochrand aus gemessen)

+, ++, +++ = scharf begrenzte, unterschiedlich große Hemmhöfe > 1mm
(vom Lochrand aus gemessen)

x = Sekret stand nicht zur Verfügung

A = vorderes rechtes Euterviertel ; B = hinteres rechtes Euterviertel ; C = vorderes linkes Euterviertel ; D = hinteres linkes Euterviertel

5. Unspezifische Hemmung von Mastitissekreten unbehandelter Kühe gegenüber *Bac. subtilis*, *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* und *Bac. cereus*

103 Mastitissekrete von 103 unbehandelten Kühen wurden im Lochtest geprüft (Tabelle 5). Bei den Mastitissekreten handelte es sich durchweg um Anfangsgemelke aus Eutervierteln mit einem Zellgehalt von $> 1 \times 10^6$ / ml und Nachweis von euterpathogenen Keimen.

Zwei Proben reagierten positiv gegenüber *Bac. subtilis* und zwei weitere gegenüber *Bac. cereus*. Der Anteil der $\pm$ - Reaktionen unter der Gesamtzahl der untersuchten Proben lag für *Bac. subtilis* bei 8,7 %, für *Bac. calidolactis* bei 3,8 % und für *Bac. cereus* bei 1,9 %.

Tabelle 5

Sensibilität verschiedener Testkeime gegenüber Mastitissekreten von unbehandelten Kühen

Mastitissekret Nr.	Hemmreaktion des Mastitissekrets gegenüber		
	Bac.subtilis (ATCC 6633)	Bac.calidolactis (C 953)	Bac.cereus (ATCC 11778)
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	±	-
9	-	-	-
10	-	±	-
11	±	±	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	±	-
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 5

(1)

20	-	-	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	±	-	-
32	-	-	-
33	±	-	+
34	±	-	±
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 5

(2)

44	-	-	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
51	$\pm$	-	+
52	-	-	-
53	-	-	-
54	-	-	-
55	-	-	-
56	-	-	-
57	-	-	-
58	-	-	$\pm$
59	-	-	-
60	-	-	-
61	-	-	-
62	-	-	-
63	-	-	-
64	$\pm$	-	-
65	-	-	-
66	-	-	-
67	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 5

(3)

68	-	-	-
69	-	-	-
70	-	-	-
71	-	-	-
72	-	-	-
73	-	-	-
74	-	-	-
75	-	-	-
76	-	-	-
77	<u>+</u>	-	-
78	-	-	-
79	-	-	-
80	-	-	-
81	-	-	-
82	-	-	-
83	-	-	-
84	-	-	-
85	+++	-	-
86	-	-	-
87	-	-	-
88	-	-	-
89	-	-	-
90	-	-	-
91	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 5

(4)

92	-	-	-
93	+	-	-
94	<u>±</u>	-	-
95	-	-	-
96	-	-	-
97	-	-	-
98	-	-	-
99	-	-	-
100	-	-	-
101	-	-	-
102	-	-	-
103	<u>±</u>	-	-

Zeichenerklärung :

- = keine Hemmreaktion erkennbar

± = kleiner, unscharfer Hemmhof < 1 mm (vom Lochrand aus gemessen)

+, ++, +++ = scharf begrenzter Hemmhof > 1 mm (vom Lochrand aus gemessen)

6. Vorkommen von Hemmstoffen in Konsummilch nach intra-zisternaler Applikation von Oxacillin mit Depotwirkung in der Trockenzeit

Um zu ermitteln, in welchem Umfang Oxacillin - Rückstände nach der in verschiedenen Phasen der Trockenzeit durchgeführten Behandlung in der für den menschlichen Verzehr in Frage kommenden Milch vorkommen, wurden das 11., 15. und 20. Gemelk post partum auf das Vorkommen von Hemmstoffen im Agardiffusionsverfahren mit *Bac. subtilis* und *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* untersucht (Tabelle 6). Es standen ausschließlich Proben des Gesamtgemelks zur Verfügung. Positive Hemmreaktionen wurden regelmäßig in Milchproben von Kühen ermittelt, die innerhalb von 21 Tagen ante partum behandelt worden waren, wenn als Testkeim *Bac. calidolactis* verwendet wurde. Von früher als am 21. Tag a.p. behandelten Kühen zeigten nur noch Gemelke von einer am 26. und einer am 30. Tag a.p. behandelten Kuh positive Hemmreaktionen. Mit *Bac. subtilis* als Testkeim konnten dagegen nur Gemelke von Kühen, die am 8., 14. bzw. 21. Tag behandelt worden waren, als positiv beurteilt werden.

Tabelle 6

Vorkommen von Hemmstoffen im 11., 15. und 20. Gemelk post partum nach intramammärer Behandlung in der Trockenzeit

Kuh Nr.	Tag der Behandlung ante partum	Nachweis von Hemmstoffen im Gemelk post partum					
		11.	15.	20.	11.	15.	20.
		(Bac.subtilis)			(Bac.calidolactis)		
1	8.	+	+	+	+++	+++	+++
2	14.	+	-	-	+	-	-
3	17.	-	-	-	++	++	++
4	18.	-	-	-	++	++	++
5	19.	-	-	-	++	++	++
6	21.	+	-	-	+++	++	+
7	26.	-	-	-	-	-	-
8	26.	-	-	-	+	-	-
9	30.	-	-	-	++	+	+
10	31.	-	-	-	-	-	-
11	34.	±	-	-	±	-	-
12	35.	-	-	-	-	-	-
13	37.	-	-	-	-	-	-
14	39.	-	-	-	±	-	-
15	44.	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung :

- = keine Hemmreaktion erkennbar

± = kleiner, unscharfer Hemmhof < 1mm (vom Lochrand aus gemessen)

+, ++, +++ = scharf begrenzter Hemmhof > 1mm (vom Lochrand aus gemessen)

IV. D I S K U S S I O N

Die eigenen Untersuchungen zielten darauf ab, festzustellen, zu welchem Zeitpunkt vor dem Abkalben die intramammäre Trockenzeitbehandlung mit einem halbsynthetischen, peni - cillinasefesten Penicillin abgeschlossen sein muß, damit eine Kontamination der Konsummilch mit Rückständen des Antibiotikums vermieden wird. Eng verbunden mit dieser Problematik war die Frage, welche Methode angewendet werden sollte, um das Isoxazolyl - Penicillin Oxacillin auch noch in geringen Mengen nachzuweisen. Es war in diesem Zusammenhang naheliegend, für den Nachweis von Oxacillin Keime der thermophilen Bakterien zu verwenden, da seit den ersten entsprechenden Untersuchungen von IGARASHI et al.(1960) und GALESLOT und HASSING (1962) diese Keime immer wieder für einen besonders empfindlichen Nachweis von Penicillin empfohlen wurden. Allerdings wurden meist biosynthetische Penicilline geprüft, so daß es bei den eigenen Untersuchungen darauf ankam, die Empfindlichkeit für Oxacillin unter den besonderen Bedingungen des beschriebenen Lochtestes im Vergleich zu dem herkömmlichen *Bac. subtilis* zu prüfen. Wegen seiner günstigen Kultivierungsbedingungen wurde *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 gewählt. Auf die auch heute noch sehr schwierige Gewinnung von Sporen dieses Testkeimes wurde verzichtet und als Einsaat ein Gemisch von Sporen und vegetativen Formen verwendet, wie es auch TERPLAN und ZAADHOF (1969) empfahlen. Es war außer-

ordentlich wichtig, festzustellen, daß unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Nachweisgrenze für Oxacillin bei Verwendung der thermophilen Testkeime um eine Zehnerpotenz niedriger lag als bei *Bac. subtilis*. Es muß nämlich erwartet werden, daß der Einsatz eines Präparates mit Depotwirkung, und um ein solches handelt es sich bei dem verwendeten Präparat, das 800 mg Stapenorsäure in Form des schwer wasserlöslichen NND-Salzes enthält, eine geringe, aber lange währende Ausscheidung des Wirkstoffes bedingt. Diese Erwartung bestätigte sich insofern, als mit *Bac. calidolactis* bei allen sechs bis zum 21. Tag ante partum behandelten Kühen in der Konsummilch Hemmstoffe festgestellt wurden, während mit *Bac. subtilis* als Testkeim der Nachweis dieser Substanzen nur bei drei Kühen gelang und die Ausscheidung auch hier wesentlich schwächer und kürzer erfolgte. Bei Kühen, die früher als am 30. Tag ante partum behandelt wurden, konnten selbst mit den thermophilen Testkeimen keine Hemmstoffe mehr sicher nachgewiesen werden. Die Interpretation der Ergebnisse bei drei im Zeitraum vom 26. - 30. Tag ante partum behandelten Kühen ist schwierig, da in den drei Gemelken einer am 26. Tag ante partum behandelten Kuh keine Hemmstoffe ermittelt wurden und alle drei Gemelke einer am 30. Tag ante partum behandelten Kuh Hemmstoffe enthielten.

Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß lediglich ab dem 11. Gemelk Kontrollen durchgeführt wurden, so daß es durchaus möglich wäre, daß in den ersten Gemelken Antibio-

tika - Rückstände vorhanden waren. Dies ist jedoch milchhygienisch insofern von untergeordneter Bedeutung, als die Milch fünf Tage nach dem Kalben, das entspricht den ersten 10 Gemelken, als verdorben zu beurteilen ist. Diese Milch dürfte in Verbindung mit § 1 (1) des Milchgesetzes im Haushalt des Erzeugers verwendet werden. Wenn jedoch Antibiotika - Rückstände vorliegen, muß die Milch als gesundheitsschädlich betrachtet werden und kann auch im Haushalt des Erzeugers nicht verwendet werden.

Schmid (1969) fand bei Studien über Verweildauer und Konzentration des Isoxazolyl - Penicillins Cloxacillin im Trockensekret bei Kühen nach der Behandlung während des Trockenstellens erhebliche Streuungen, deren Ursache keine Abhängigkeit von der Höhe der vorausgegangenen Milch- oder Fettleistung, von Alter und Rasse sowie Eutergesundheitszustand erkennen ließen. Nach den eigenen Untersuchungen mußte man zu dem Schluß kommen, zu empfehlen, die letzte Behandlung mit dem getesteten Präparat 30 Tage vor dem zu erwartenden Abkalbetermin abzuschließen. Nach entsprechenden Untersuchungen an einem biosynthetischen Penicillin mit Depotwirkung empfehlen auch GEDEK und RICHTER (1972) diese Frist. Die hohe Empfindlichkeit des Nachweises mittels thermophilen Sporenbildnern macht es wahrscheinlich, daß bei einer Kontamination der Konsummilch weniger Bedenken von Seiten der Milchtechnologen im Hinblick auf eine Beeinträchtigung der Verarbeitungsfähigkeit der Milch, als gesundheitliche Bedenken bestehen. Bei allen halbsynthetischen

Penicillinen ist mit einer Allergie, sogar mit einer Kreuzallergie zu rechnen (WALTER und HEILMEYER, 1969).

Natürlich sollte im allgemeinen die Behandlung nach dem letzten Melken in der Laktation vorgenommen werden, aber es gibt genügend Anlaß, auch später zu behandeln, z.B. klinische Eutererkrankungen, zweite Behandlung in einer späteren Phase der Trockenzeit zur Verbesserung des Therapieerfolgs oder Behandlung sämtlicher trockenstehender Kühe bei Einleitung von Sanierungsmaßnahmen in stärker infizierten Herden. Auch sollte eine zu kurze Dauer der Trockenzeit hinsichtlich der Gefahr einer Kontamination der Konsummilch berücksichtigt werden. Bei notwendigen Behandlungen in einer späteren Phase der Trockenzeit könnte man ein Präparat mit kürzerer Verweildauer im Euter verwenden. Ein Abmelken des Eutersekrets 1 - 2 Tage vor dem Kalben empfehlen AARRE und MADSEN (1970). Dieses Abmelken des Vorkolostrums kann aber eigentlich im Hinblick auf die Gesundheit und Ernährung des Kalbes nicht bedenkenlos empfohlen werden. Gegen ein häufiges Abmelken nach dem Kalben würden zwar in dieser Hinsicht keine Bedenken bestehen, doch dürften arbeitsmäßige Schwierigkeiten auftreten und der Effekt einer schnelleren Ausscheidung des Antibiotikums dürfte nicht so hoch zu veranschlagen sein wie beim Abmelken des Vorkolostrums. Eine Identifizierung des in den Gemelken nachgewiesenen Hemmstoffes wurde nicht vorgenommen, doch deuten die in Tabelle 6 aufgezeichneten Ergebnisse darauf hin, daß der Nachweis dieser Substanzen eigentlich nur auf den Einsatz des Arznei-

mittels zurückzuführen ist. Es gibt zur Zeit keine Möglichkeit, die Isoxazolyl - Penicilline mit Hilfe von Enzymen, z.B. Penicillinase, und chemischen Substanzen zu identifizieren (WALTER und HEILMEYER, 1969; KRAACK und TOLLE, 1969). Daß es unspezifische Reaktionen bei beiden Testkeimen geben kann, ist nicht zu widerlegen. Doch zeigen die eigenen Untersuchungen mit Kolostralmilch und Mastitissekret, Euterssekrete also, bei denen man am ehesten eine Hemmung von Testbakterien erwarten würde, daß eine positive Reaktion nach dem Tiefgefrieren selten eintritt. Es könnte aufgrund unspezifischer, also nicht auf Antibiotikawirkung beruhender Reaktionen nicht ein solches Reaktionsschema entstehen, wie es in der Tabelle 6 aufgeführt ist. Die Häufung stark positiver Reaktionen bei der Milch der Kühe Nr. 1 - 6 wäre bei spielsweise ohne Antibiotikawirkung nicht erklärbar, da die Milch der Kühe Nr. 10 - 15, obwohl es sich ebenfalls um die 11., 15. und 20. Gemelke post partum handelte, keine positiven Reaktionen verursachte. Im Extremfall wurde eine Verweildauer des Oxacillins im Euter von 40 Tagen festgestellt. Das ist besonders bemerkenswert, zumal in der späten Phase der Trockenzeit spezifische Veränderungen während des Aufbaus des Alveolarsystems im Euter vor sich gehen und nach dem Abkalben eine hohe Milchleistung einsetzt, beides Faktoren, von denen man eine Abkürzung der Ausscheidung erwarten könnte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Trockenzeit wurde 15 klinisch eutergesunden Kühen das halbsynthetische Isoxazolyl - Phicillin Oxacillin vorwiegend in Form eines schwer wasserlöslichen Salzes intrazisternal appliziert und die Ausscheidungszeiten im 11., 15. und 20. Gemelk post partum mit Hilfe des Agardiffusionsverfahrens ermittelt. Alle sechs, 21 Tage ante partum behandelten Kühe schieden Oxacillin - Rückstände mit einer Ausnahme noch im 20. Gemelk post partum aus. Bei einer der sechs Kühe waren diese Rückstände nur im 11. Gemelk post partum nachzuweisen. In der Milch der früher als am 30. Tag ante partum behandelten Kühe konnten keine derartigen Rückstände festgestellt werden. Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen dem Bac. subtilis- und Bac. calidolactis - Lochtest waren beträchtlich. Die Behandlung in der Trockenzeit sollte mindestens 30 Tage vor der zu erwartenden Kalbung vorgenommen werden.

2. Unter 103 Mastitissekreten (Viertelgemelke) von 103 un- behandelten Kühen reagierten zwei Proben im Lochtest gegen- über Bac. subtilis und zwei weitere Proben gegenüber Bac. cereus positiv, während gegenüber Bac. calidolactis keine positive Reaktion vorlag. 105 Kolostralmilchproben (Viertel- gemelke) von 27 unbehandelten Tieren wurden ebenfalls gegen- über diesen drei Testkeimen im Lochtest geprüft. Vier Proben reagierten gegenüber Bac. subtilis positiv und je eine gegen-

über *Bac. calidolactis* bzw. *Bac. cereus*. Die Quote der fraglichen Reaktionen lag bei Mastitissekreten und Kolostralmilchproben je nach Testkeim zwischen 20,9 und 1,9 %.

3. Die Nachweisgrenze für Oxacillin lag beim Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtestes mittels *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953) um eine Zehnerpotenz niedriger als mittels *Bac. subtilis* (ATCC 6633).

S U M M A R Y

1. At different times during the dry-period 15 clinical udder-healthy cows received an application of halfsynthetic Isoxazolyl-Penicillin Oxacillin mainly in the form of difficult watersoluble salt as intramammary infusion. The results of the elemination in the 11th, 15th and 20th lactation post partum was obtained through the Agar-Hole-Method. Six cows treatet 21 days ante partum, eliminated Oxacillin-residues with the exception of one cow, after the 20th lactation post partum. In one of the six cows the residues were only noticeable up to the 11th lactation period. No noticeable residues were observed in the milk of the cows treatet prior the 30th day ante partum. The difference in the results between the Bac. subtilis- and Bac. calidolactis-Agar-Hole-Method were considerable. The treatment during the dry-period should be completed at least 30 days prior to birth.

2. Only two of the 103 samples of irritated udders of 103 untreatet cows showed reaction in the Agar-Hole-Method with Bac. subtilis and two additional tests verses Bac. cereus were positiv, whereas no positiv reaction verses Bac. calidolactis could be determined. 105 colostrum - samples of 27 untreatet cows were also tested in the aforementioned method. Four samples verses Bac. subtilis reacted positiv and only one verses Bac. calidolactis and Bac. cereus. The

difference of the unclear reactions of the colostrum samples and the samples of irritated udders depending on the testbacteria was between 20,9 and 1,9 %.

3. It was proven, that the bacteriacount for Oxacillin by the Agar-Hole-Method with *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* was one tenth lower than with *Bac. subtilis*.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AARRE, K. und J.A. MADSEN (1970)

Eutertherapie in der Trockenzeit und Antibiotika in der
Milch nach dem Kalben (dänisch).

Medlemsbl. danske Dyrlaegerforen 53, 837

ASHTON, D.H. und F.F. BUSTA (1968)

Milk components inhibitory to bacillus stearothermophilus.

J. Dairy Sc. 51, 842

AUCLAIR, J.E. und A. HIRSCH (1953)

The Inhibition of Microorganisms by raw Milk.

I. The occurrence of inhibitory and stimulatory phenomena.

Methods of estimation.

J. Dairy Research 20, 45

AUTERHOFF, H. (1971)

Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 6. Auflage

Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart

BECKER, W. (1966)

Zerstörung von Antibiotika in der Milch durch Kurzzeit -
erhitzung.

Milchwiss. 21, 155

BLOBEL, H. (1960)

Concentrations of Penicillin in Milk Secretions and
Blood Serums of Cows - Following Intramammary Infusion
of One or More Quarters.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 137, 110

BRUNN, H.-J. (1971)

Untersuchungen über die Anwendung einiger Nachweismethoden
zur Feststellung von Antibiotika in Milch.

Vet. Med. Diss. Gießen

BRUNSCHWILER, F. (1961)

Die Ausscheidungsdauer verschiedener Antibiotika bei
intramammärer Behandlung des Rindes.

Vet. Med. Diss. Bern

BUSTA, F.F. (1966)

Milk component(s) inhibitory to bacillus stearothermophilus.

J. Dairy Sc. 49, 751

CANNON, R.Y., HAWKINS, G.E. und A.M. WIGGINS (1962)

Duration of secretion of bacteriostatic drugs in milk.

I. Penicillin, following oral and parenteral administration.

J. Dairy Sc. 45, 769

DIEMAIR, W. und W. RÖDDER (1959/60)

Verhalten der Antibiotika in Lebensmitteln.

Zschr. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 4, 265

DIERNHOFER, K. (1955)

Epithel- und andere Gewebsschranken in der Chemotherapie.

Wien. tierärztl. Mschr. 42, 775

DOLD, H. (1934)

zit. nach Pschyrembel, W.: Klinisches Wörterbuch

Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, 1964

DRAGON, G. (1958)

Ein Beitrag zur Ermittlung von Hemmstoffen in der Trinkmilch mittels Tetrazoliumsalz als Indikator und die

Möglichkeit ihrer weiteren Differenzierung mit Hilfe des Kluyver - Gärungstestes.

Milchwiss. 13, 304

FLEISCHMANN, K. (1954)

Läßt sich Penicillin in der Milch nachweisen ?

Dtsch. MolK.-Ztg. 75, 534

FOKKER, A.P. (1890)

Über bakterienvernichtende Eigenschaften in der Milch.

Zschr. Hyg. 9, 41

FRANK, H. (1961)

Nachweis von Hemmstoffen in der Milch einschließlich
Reinigungs- und Desinfektionsmittel.

Dtsch. Molk.-Ztg. 82, 1542

FRANK, H. (1963)

Antibiotikakontrolle und Möglichkeiten zur Vermeidung
von Schäden im Betrieb.

Molk.-u.-Käs.-Ztg. 14, 1453

FRANK, H. (1963)

Folgen der Euterbehandlung mit Antibiotika für die Milch-
wirtschaft.

Dtsch. Molk.-Ztg. 84, 1632

FRANK, H. (1965)

Nachweis von Hemmstoffen in Milch und Milchpulver.

Milchwiss. 20, 361

FRANK, H. und E. SCHRAUDY (1965)

Gefärbte Mastitismittel in der molkereitechnischen und
tierärztlichen Praxis.

Milchwiss. 20, 647

FRIMMER, M. (1969)

Pharmakologie und Toxikologie.

F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York

GALESLOT, TH. E. und F. HASSING (1962)

Een snelle en gevoelige methode om met papierschijtjes penicilline in melk aan te tonen.

Ned. Melk-en Zuiveltijdschrift 16, 89

GEDEK, W. und O. RICHTER (1972)

Arzneimittel - Hemmstoffe in der Milch nach intramammärer Behandlung in der Trockenzeit.

Zbl. Vet. Med. B, 19, 40

GROSSKLAUS, D. und R. LEVETZOW (1966)

Ein Beitrag zur Standardisierung des Hemmstoffnachweises in Milch und Milcherzeugnissen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 79, 128

HAMANN, I. und B. BLÜMEL (1967)

Untersuchungen über die Eignung des Methylenblau - Reduktionstestes und des Bactiasstrip - Testes für die routinemäßige Untersuchung von Milchproben auf Hemmstoffe.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 80, 305

HAUKE, H. (1965)

Mitteilung über die Ausscheidungsdauer und -menge von Sulfonamiden mit der Milch bei intravenöser und intrazisternaler Applikation.

Mh. Vet. Med. 20, 165

HAUKE, H. (1965)

Mitteilung über die Ausscheidungsdauer von Hemmstoffen mit der Milch bei der intramuskulären und intrazisternalen Applikation von Antibiotikapräparaten.

Mh. Vet. Med. 20, 168

HAUKE, H. (1968)

Untersuchungen über die Inaktivierung antibiotikahaltiger Milch durch die Pasteurisierung.

Mh. Vet. Med. 23, 105

HOBBIGER, A. (1965)

Fremdstoffe in der Milch.

Milchwirtschaftl. Ber. 5, 41

HOBBIGER, A. (1966)

Die hygienische Euterbehandlung unter besonderer Berücksichtigung farbstoffmarkierter Eutermedikamente.

Dtsch. Molk.-Ztg. 87, 1677

IGARASHI, R. T., BAUGHMAN, R.W. , NELSON, F.E. und P.A.

HARTMAN (1960)

Rapid antibiotic assay methods using bacillus stearothermophilus.

J. Dairy Sc. 43, 841

KÄSTLI, P. (1963)

Milchkunde und Milchhygiene

II. Teil : Milchfehler

Buchverlag Verbandsdruckerei AG, Bern

KIERMEIER, F. (1961)

Wissenschaftlicher Jahresbericht des Milchwirtschaftlichen
Instituts der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft.

Weihenstephan

KLEIN, P. (1957)

Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen
Laboratoriumspraxis.

Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg

KÖPKE, G. (1965)

Nachweis der Antibiotika in Milch

Vet. Med. Diss. Berlin (Humboldt- Universität)

KOSIKOWSKI, F.V. und R.A. LEDFORD (1960)

Test for antibiotics in milk.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 136, 297

KOTTER, L., TERPLAN, G. und G. PFEIFFER (1962)

Über den Einfluß von Desinfektionsmittelresten auf die
Beurteilung von Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 13, 9

KOTTER, L., TERPLAN, G. und H. SCHULZ (1959)

Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln
tierischer Herkunft.

Arch. Lebensmittelhyg. 10, 145

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967)

Brillantschwarz - Reduktionstest mit Bac. stearothermophilus
var. calidolactis zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

Milchwiss. 22, 669

KRAACK, J. und A. TOLLE (1969)

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillant -
schwarz - Reduktionstest.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145

KUNDRAT, W. (1957)

Neues zum Problem Käsetauglichkeit der Anlieferungsmilch.

Molk.-u.-Käs.-Ztg. 8, 1528

KUSCHINSKY, G. (1960)

Häufigkeit, Formen und Verlauf der Penicillinallergien.

Dtsch. Med. Wschr. 85, 789

LANG, K. (1967)

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Hemmstoffen
in der Milch.

Milchwiss. 22, 230

LERCHE, M. (1966)

Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

LIMMER, H.-D. (1968)

Hemmstoffe in der Milch. - Erfahrungsbericht

Molk.-u.-Käs.-Ztg. 19, 1604

LISKA, B.J. (1960)

A direct microscopic method for detection antibiotic activity in milk.

J. Milk Food Tech. 23, 117

McGILLIVRAY, W.A. (1964)

Englische Molkereien untersuchen die Milch auf Antibiotika.

Molk.-u.-Käs.-Ztg. 15, 1043

MAECK, K. (1969)

Zum Hemmstoffnachweis in Milch unter Verwendung von

Joghurt - Säuerungsverfahren und von Brillantschwarzreduktionstesten mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

Vet. Med. Diss. Hannover

MEEVES, K.H. und SL. MILOSEVIC (1954)

Untersuchungen zur biologischen Antibiotika - Bestimmung in unsterilen Substanzen mit besonderer Berücksichtigung der Rohmilch.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 6, 59

MIETH, K. und J. WILKE (1965)

Die Ausscheidungsdauer verschiedener antibiotikahaltiger Mastitispräparate durch die Milch.

Mh. Vet. Med. 20, 361

MODESTO YAO und H.W. WALKER (1967)

Liquid Medium for Production of Spores by *Bacillus stearothermophilus*.

Applied Microbiology 3, 455

MOL, H. und E.C. BAKKER- DE KOFF (1969)

Antibiotika - Rückstände in der Milch von Kühen nach Anwendung und Mißbrauch von intramammären Infusionen eines Langzeit - Penicillinpräparates (holländisch).

Tijdschr. Diergeneesk. 94, 608

MOL, H., BRANDSMA, S. und E. C. BAKKER- DE KOFF (1970)

Einfluß der Dauer der Trockenzeit auf das Vorkommen von Antibiotika - Rückständen in der Milch nach Behandlung mit Penicillin - Präparaten zu Beginn der Trockenzeit (holländisch).

Tijdschr. Diergeneesk. 95, 785

NEAL, C.E. und H.E. CALBERT (1955)

The use of 2,3,5,-triphenyltetrazoliumchloride as a test for antibiotic substances in milk.

J. Dairy Sc. 38, 629

NEAVE, F.K., SMITH, A., DODD, F.H. und P.J. LARKIN (1967)

Dry Cow Therapy.

Vet. Rec. 81, 174

OBIGER, G. (1962)

Fragen der Mastitisbehandlung und deren Auswirkung auf
die hygienische Beschaffenheit der Molkereimilch.

Milchwiss. 16, 359

OBIGER, G. (1962)

Zur Frage der Anwendung angefärbter Mastitistherapeutika.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 14, 277

OBIGER, G. (1963)

Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch und Methoden zu
ihrem Nachweis.

Arch. Lebensmittelhyg. 14, 10

ORMISTON, E.E., ALBRIGHT, J.L., WITTER, L.D. und B.O. BRODIE

(1960)

Observations on the infusion of penicillin in the mammary
gland of the bovine.

J. Dairy Sc. 43, 1506

OVERBY, A.J. (1954)

Antibiotics in milk.

Dairy Sc. Abstr. 1b, 2

PALMER, J.M.A. und F. V. KOSIKOWSKY (1967)

Simple ultrasensitive test for detecting penicillin in milk.

J. Dairy Sc. 50, 1390

PICHNARCIK, J., WENZEL, S. und W. GIBKE (1969)

Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen und Muskulatur von Schlachttieren.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 272

PLJACHIN, G. (1951)

Der Einfluß des Penicillins auf einige der Gärungsprozesse der Molkereiwirtschaft.

Milchwiss. 7, 244

PORTMANN, A. und J.E. AUCLAIR (1959)

Relation entre la Lactenine 2 et la Lactoperoxydase.

Le Lait 39, 147

RACKOW, H.G. und W. WELZ (1964)

Weitere Ergebnisse und Erfahrungen mit einem Hemmstofftest bei Milchuntersuchungen.

Arch. Lebensmittelhyg. 15, 49

RANDALL, W.A., DURBIN, C.G., WILNER, J. und J.-H. COLLINS
(1953/54)

Antibiotic concentration and duration in animal tissue
and body fluids. I. Blood serum and milk of cows.

Antibiotics Annual

Medical Encyclopedia, Inc. N.Y., 421

REHM, F.W. (1961)

Zur Frage der Hemmstoffe in der Milch.

Molk.-Ztg. Welt der Milch 15, 448

SCHLEIMINGER, K. (1958)

Produktionsstörungen durch Antibiotika.

Dtsch. Molk.-Ztg. 79, 1461

SCHMID, G. (1969)

Verweildauer und Verteilung von Benzathin - Cloxacillin
im trockenstehenden Euter der Kuh.

Vet. Med. Diss. München

SCHMIDT, O.C. (1962)

Untersuchungen über den Nachweis von Antibiotika in der
Milch.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75, 228

SCHÖNHERR, W. (1967)

Tierärztliche Milchhygiene.

S. Hirzel Verlag, Leipzig

SEELEMANN, M. (1961)

Sind wir in der Bekämpfung der Mastitiden auf dem richtigen Wege?

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 13, 425

SEELEMANN, M. und G. OBIGER (1958)

Ätiologie, Prophylaxe und Therapie der Euterkrankheiten.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 10, 233

SEELEMANN, M. und K.H. WEGENER (1957)

Beitrag zur Frage der Gesundheitsschädlichkeit von Desinfektionsmittelresten in der Milch.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 9, 485

SEIDEL, G. (1967)

Fragen der Antibiotika - Resistenz der Mikroorganismen sowie der Antibiotikabehandlung von Tieren und Lebensmitteln tierischer Herkunft.

Die Nahrung 11, 457

SETTERGREN, J. und L. THOREN (1968)

Konzentration von Penicillin und Streptomycin im Serum, in der Milch und im Harn nach intrauteriner Zufuhr.

Schweiz. Arch. Tierheilkunde 110, 206

SILVERMAN, G.J. und F.V. KOSIKOWSKY (1952)

Systematic Testing of Inhibitory substances in milk.

J. Milk Food Tech. 15, 120

SINELL, H.-J. (1954)

Einige neuere Probleme bei der Tierärztlichen Milch-
untersuchung.

Tierärztliche Umschau 19, 42

SMITH, A., NEAVE, F.K., DODD, F.H., JONES, A. und D.N.

GOE (1967)

The persistence of cloxacillin in the mammary gland when
infused immediately after the last milking of lactation.

J. Dairy Research 34, 47

STORGARDS, T. (1962)

Nachweis von Penicillin und anderen Antibiotika in Milch.

Milchwiss. 17, 369

STURM, W. (1955)

Zum biologischen und chemischen Nachweis einiger Antibiotika.

Dtsch. Molk.-Ztg. 76, 832

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967)

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch -
eine kurze Übersicht.

Milchwiss. 22, 761

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1969)

Der Nachweis von Hemmstoffen in der Milch mit *Bacillus*
stearothermophilus var. *calidolactis* im Agardiffusionstest
und TTC - Schnelltest.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 279

THOME, K.E. (1953)

Einfluß von Antibiotika - Rückständen auf die Käseherstellung.

Milchwiss. 8, 139

THOMPSON, P. J. und O.A. THAMES (1967)

Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*.

Applied Microbiology 15, 975

WAGNER, G. (1965)

Untersuchungen über antibakterielle Hemmstoffe im Zitengewebe des Rindereuters.

Vet. Med. Diss. München

WALTER, A.M. und L. HEILMEYER (1965)

Antibiotikafibel - Antibiotika und Chemotherapeutika.

2. Aufl. Verlag Georg Thieme, Stuttgart

WELCH, H. (1957)

Problems of antibiotics in food as the Food and Drug Administration sees them.

Am. J. Public Health 47, 701

WELZ, W. (1961)

Beitrag zur Methodik biologischer Hemmstoffteste in Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 12, 196

WILSON, C.D. und J. DAVIDSON (1961)

The Control of Staphylococcal Mastitis.

Vet. Rec. 3, 321

WODSAK, W. (1959)

Bedeutung und Nachweis der Antibiotika in der Milch.

Die Nahrung 3, 729

WRIGHT, W.W. und L.C. HAROLD (1960)

Antibiotic residues in milk after parenteral and oral
administration in cows.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 137, 128

Herrn Professor Dr. G. T e r p l a n danke ich für
die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Priv. Doz. Dr. W. G e d e k bin ich für die
wertvollen Anregungen, die jederzeit gewährte Unter-
stützung und seine große Anteilnahme am Gelingen der
Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

Am 1. Oktober 1945 wurde ich, Barbara Wallner, in Sønderborg in Dänemark geboren.

1949 kam ich nach Deutschland und besuchte ab 1952 die Volksschule in Bochum - Werne. Vier Jahre später wurde ich in das Lessing - Gymnasium in Bochum - Langendreer aufgenommen, wo ich im Frühjahr 1966 das Abitur bestand. Anschließend, mit dem Sommersemester 1966, begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig - Maximilians - Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich im Februar 1971 mit dem Staatsexamen abschloß. Seitdem war ich mit meiner Doktorarbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch beschäftigt.

